

## 4. GÉNMANIPULÁLT MIKRO-ORGANIZMUSOK

A biotechnológiai ipar termékei:

- Elsődleges anyagcsere-termékek  
Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez
- Másodlagos anyagcsere-termékek  
Amelyek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez, csak kedvező körülmények (pl. tápanyaghiány) hatására indul be. A termék molekulának nincs közvetlen haszna.
- Fehérjék, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan bevitt gén(ek) termékei.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

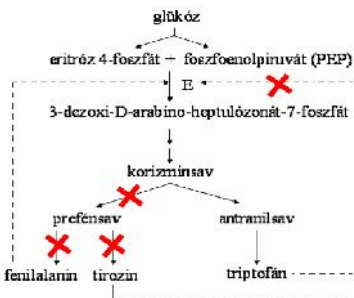
### 4.1. Elsődleges anyagcsere-termék: például: triptofán

Bioszintézis: szénhidrátokból sok lépéssel. A japánok oldották meg *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel

Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:  
Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>,

Rezisztencia:  
5-Me-Trp<sup>r</sup>



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 4.2. Másodlagos anyagcsere-termékek: az antibiotikumok

= Mikroorganizmusok által termelt szekunder metabolitok, melyek más mikroorganizmusokat elpusztítanak vagy gátolják fejlődésüket.

Alkalmazásuk:

Humán gyógyászat: mikrobiális fertőzések gyógyítására (a hatékony koncentrációban az emberi szervezetet ne károsítsa)

Rákellenes antibiotikumok: citosztatikus hatásúak, a kemoterápia eszközei

Állatgyógyászat

Állattenyésztésben: takarmány-adalékként



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Egy kis történelem

- 1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemin)
- 1912 - Salvarsan, szerves arzén származék, vérbaj ellen, (Ehrlich-Hata)
- 1936 - Szulfonamidok (p-amino-szulfonsav-amidok), Domagk
- 1929 - penicillin észlelése, Fleming
- 1944 - a penicillin ipari gyártása
- 1944 - 1960 új antibiotikumok felfedezésének korszaka
- 1950 - félszintetikus származékok
- 1990 - nincsenek új molekulák, a szabadalmak lejártak → generikus terméké váltak, verseny a piacon.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Antibiotikumok

Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikus). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

- Miért ilyen kevés?
- toxicitás
  - nem elég hatásos, van nála jobb
  - mellékhatások
  - rezisztencia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

---

---

---

---

---

---

---

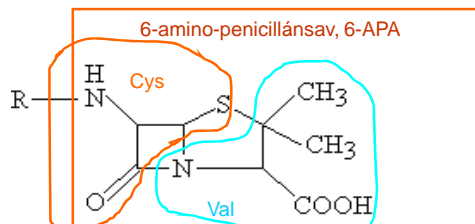
---

---

---

### Példa: penicillin (csoport)

Szerkezet: alapváz: 6-amino-penicillánsav  
két aminosavból tevődik össze, cisztein + valin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A penicillin tulajdonságai

**BOMLÉKONY!** Savak, lúgok és enzimek hatására többféle reakcióban is gyorsan bomlik – a gyomorsavtól is meg kell védeni.

Mennyiségét nem súlyra mérik, hanem az antibiotikus hatását:

1 biológiai egység: 50 ml-nyi standard összetétel tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását.

1 IU = 0,6 µg G-penicillin Na sónak felel meg.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

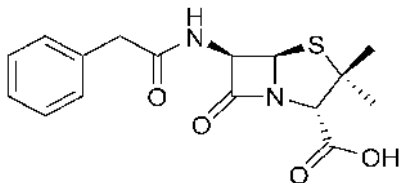
---

### G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc fenil-ecetsav

Ez a fermentált alapmolekula, ebből gyártják a többit.

Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhető, csak injekcióban adták.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

---

---

---

---

---

---

---

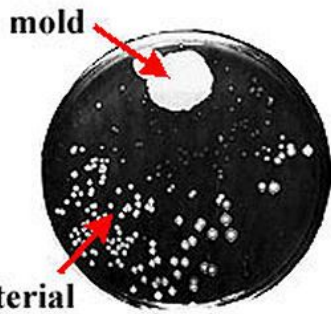
---

---

---

### Fleming's original plate:

1929 A. Fleming, izolálás, tisztítás, sze  
1940 hadianyaggá v  
1943 klinikai kipróbál  
felületi tenyészet, Pe  
1944 2,5 tonna  
szubmerz tenyészet,  
1946 32 tonna  
1952 Magyarország  
1980 kb. 30.000 tonn  
2000 ~ 100.000 tonn



BME

**bacterial colonies**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A penicillin gyártás fejlesztése

Fermentációs úton, mert a kémiai szintézis nem gazdaságos.  
A technológia fejlesztése két f irányban mehet:

<p><b>Törzsmunka (biológia):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- törzszólalás</li> <li>- indukált mutáció</li> <li>- szelekció</li> <li>- törzsfenntartás</li> </ul>	<p><b>Technológia (mérnöki):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Felületi/szubmerz</li> <li>- Prekurzorok (4-8 x)</li> <li>- Tápladatoptimálás (cukorlimit, C/N, Fe ion)</li> <li>- Leveg ztetés, reaktor</li> <li>- Szabályozások (pH, t)</li> </ul>
---	--

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Törzsnemesítés

**Célok:**

- hozamnövelés,
- fermentációs illetve feldolgozási kritériumok szerinti hatékonyság növelés
- az eredeti pigment-termelés megszüntetése

**Eszközök:**

- a génmanipuláció igen bonyolult (sok gén vesz részt a folyamatban), a titernövekedés túlnyomó részét a régi (65 év – több ezer lépés) mutációs–szelekciós törzsjavitással érték el (~2-3 ppb → ~50.000 ppb).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

---

---

---

---

---

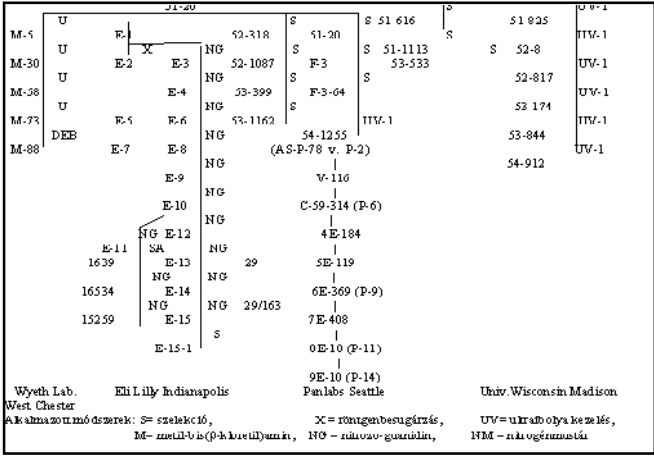
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## A gyártás lépései:

1. Törzsfenntartás
2. Inokulum lépcs (k)
3. F fermentáció
  - "Fed batch" = rátáplálásos szakaszos, glükóz limit
  - Vágás: kb. 80.000 IU/ml ~ 5 % -os oldat
4. Feldolgozás, kulcslépése:  
extrakció: vízzel nem elegyed szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléb l



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Fermentáció

Jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van:

Els szakasz (kb. 40 h): a sejtek elszaporítása, jó tápanyag-ellátás intenzív levegőztetés, keverés, elsődleges anyagcsere.

Tápanyagforrások az első szakaszban:

- szénforrások: néhány könnyen bontható cukor (glükóz, melasz), ami a szaporítás végére elfogy
- nitrogén: ebben a szakaszban még lehet  $\text{NH}_4$  sók formájában, de az a jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Fermentáció

Második szakasz, termelési fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, kikényszerített másodlagos anyagcsere.

Tápanyagellátás a második szakaszban:

- szénforrás: limitáció (régén: nehezen bontható vegyületek: laktóz, keményítő, ma: glükóz adagolás apránként, az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves vegyületek, fehérje formájában: kukoricalekvár, szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt kis koncentráció, apránként adagolva
- foszfát: jelenlétében nem megy a másodlagos anyagcsere, ezért elfogyása után nem adagolnak többet
- prekursor: fenil-ecetsav, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 2-4 g/l sávban tartják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

---

---

---

---

---

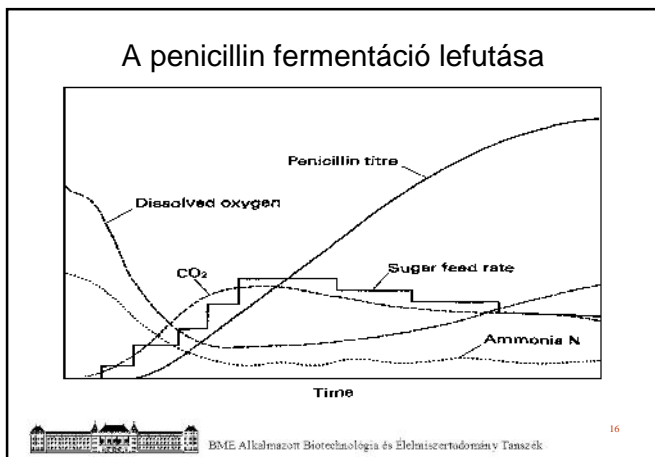
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Prekurzor

Olyan kémiai szintézissel előállított vegyület, amit „készén” adunk a mikroorganizmusnak, és az beépíti a termék molekulába. Így a tenyészetnek nem kell e molekularészt felépíteni – anyagot és energiát takarítunk meg a mikrobának.

**G penicillin**

**Fenil-acetsav**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Félszintetikus penicillinek

Fermentált alapvegyületek:

**Natural penicillins**

**Penicillin G**  
(Gram-positive cocci)

**Penicillin V**  
(acid resistant)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 18

---

---

---

---

---

---

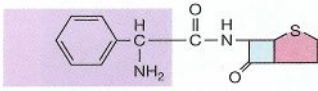
---

---

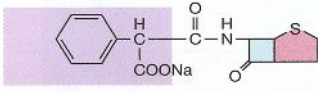
---

---

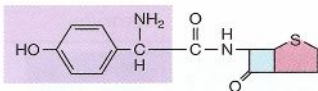
### Félszintetikus penicillinek




**Ampicillin**  
(broad spectrum,  
acid resistant)



**Carbenicillin**  
(broad spectrum)



**Amoxicillin**  
(broad spectrum)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

---

---

---

---

---

---

---

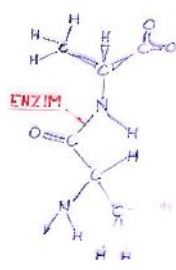
---

---

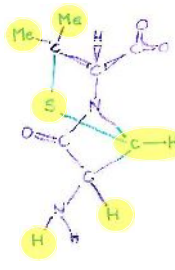
---

### A penicillin hatásmechanizmusa: szerkezet-analógián alapul

**D-Ala-D-Ala**




**penicillin**



Irreverzibilisen kapcsolódik egy enzim kötőhelyéhez

a sejtfal-szintézis leáll

a sejt nem tud növekedni, elpusztul



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

---

---

---

---

---

---

---

---

---


---

### A szekunder metabolit gyártás összefoglalása

**Törzsfejllesztés:**  
a génmanipuláció majdnem lehetetlen, mert a bioszintézis nagyon sok lépésből áll, és sokféle szabályozás érvényesül. A klasszikus mutációs – szelekciós módszert ismételt évtizedeken keresztül. Lassan eléri a határait.

**Technológia:**  
Kétszakaszos fermentáció, elbővívelés, majd termékképzés

**Piaci helyzet:**  
a szabadalmak lejártak, generikus készítmények, éles versenyhelyzet, nyomott árak. A gyógyszerkönyvek szigorú előírásai miatt a kínaiak még nem tudnak elretörni, de az indiaiak igen (outsourcing)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---